

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikka

Bioteekniikka

2011

Miia Nissinen

HOMOGEENINEN FLUORESENSSIIN PERUSTUVA FILAMENTTIFAAGIN TIITTERIMÄÄRITYS



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Miia Nissinen

TURUN AMMATTIKORKEAKOULU OPINNÄYTETYÖ

Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston biotekniikan osastolla kehitetyn uuden leimateknologian sovellusten tutkimiseen. Leimateknologia perustuu ajatukseen, että leimamolekyyli koostuu kahdesta osasta, jotka ainoastaan fyysisesti yhteen tuotuina muodostavat aktiivisen leiman. Tämä mahdollistaa erittäin herkkien homogeenisten määritysten kehittämisen. Menetelmä soveltuu erityisen hyvin nukleiinihappojen pitoisuusmäärityksiin. Uutta leimateknologiaa pyrittiinkin soveltamaan filamenttifaagien pitoisuuden mittaukseen. Faagien yksinauhainen-DNA-genomi toimii templaattina, jota mitataan ja jonka pitoisuuden avulla näytteen faagimäärä voidaan päätellä.

Opinnäytetyön molemmat osat leimattiin erikseen ja puhdistettiin HPLC -tekniikan avulla. Menetelmälle määritettiin sopivat olosuhteet, ja mitattiin menetelmän herkkyyttä. Ohessa kokeiltiin jo käytössä olevia työläitä aikaisempia faagipitoisuuksien määrittämenetelmiä.

Menetelmän herkkyys määriteltiin riittävän pieneksi mahdollistaen menetelmän hyödyntämisen faagipitoisuuksien analysointiin faafinäyttötekniikan yhteydessä. Huomattiin kuitenkin, että suurissa templaattipitoisuuksissa signaali ei enää kasva lineaarisesti. Taustasignaalin muodostumisessa huomattiin eroja koetinpitoisuuksia nostettaessa. Huomattiin kasvatusmediumin olevan häiritsevä suurina pitoisuuksina mittauksissa.

ASIASANAT:

filamenttifaagi, homogeeninen määrittäminen, faafinäyttötekniikka, absorbanssi menetelmä, FRET

Miia Nissinen

HOMOGENEOUS FLUORESCENCE BASED ASSAYS FOR TITERING OF FILAMENTOUS PHAGE

This thesis is related to applications of a novel fluorescence label technique developed at the Department of Biochemistry and Food Chemistry, Laboratory of Biotechnology, University of Turku. The fluorescence based assay technique is based on the idea that the intrinsically fluorescent lanthanide chelate could be split into two distinct components: a nonfluorescent ion carrier chelate and a light harvesting antenna ligand. The two components form a functional fluorophore only when brought in contact with each other. The label technique enables development of sensitive homogeneous assays and is particularly well suited for nucleic acid assays. In this thesis the new label technique was applied to the development of an assay for the determination of filamentous phage concentration.

In the practical part of the thesis, filamentous phage specific oligonucleotide probes were labeled with the label components and purified by HPLC. The reaction conditions were optimized to enable sensitive phage detection and the assay was shown to allow phage quantification directly from phage culture media samples.

The method was considered to be highly sensitive for the measurement of phages. It showed a wide dynamic range, however, with high template concentrations non-linear signal growth and eventually signal drop off was observed due to the hook-effect. The background signal grew together with the probe concentration. It was also observed that the assay tolerates small concentrations of culture medium. However, with high culture media concentrations the performance of the assay was found to be compromised by the components of the medium.

KEYWORDS:

filamentous phage, homogeneous hybridization, phage display, FRET

SISÄLTÖ

1 JOHDANTO	6
1.1 Faaginäyttötekniikka	6
1.2 Faagien kvantifiointimenetelmät	9
1.2.1 Tiitterimääritys	9
1.2.2 Absorbanssimenetelmä	10
1.2.3 qPCR	11
1.2.4 Hybridisaatiomääritys	11
1.3 Fluoresoivat leimat	12
1.3.1 Nukleiinihappojen detektio	13
1.3.2 Fluoresenssi resonanssienergian siirto FRET	13
1.3.3 Aikaerotteinen lantanidikelaattileimojen fluoresenssi	14
1.3.4 Lantanidikelaattien komplementaatiotekniikka	16
1.4 Työn tarkoitus	19
2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT	19
2.1 Europium kelaatti	19
2.2 Europium Antenna – modifikaatio 1	20
2.3 Europium antenna – modifikaatio 2	21
2.4 Faagitiitterin määrittäminen infektiivisyyden perusteella	21
2.5 Koetinpitoisuuden optimointi	22
2.6 Koettimen herkkyysanalyysi	22
2.7 Tausta signaalivertailu	23
2.8 Auttajafaagien tuotto	23
2.9 Kasvatetun auttajafaagin pitoisuus	23
2.10 Homogeeninen tiitterimääritys kasvatetuille helperfaageille	24
3 TULOKSET JA ANALYSOINTI	24
3.1 Koetinpitoisuuden optimointi	24
3.2 Herkkyysanalyysi koettimelle	26
3.3 Taustasignaali	28
3.4 Kasvatetun auttajafaagin pitoisuus	28
3.5 Homogeeninen faagitiitterimääritys kasvatetuille auttajafaageille	30
4 ARVIOINTI	32
5 LÄHTEET	33

LIITTEET

Liite 1. NAP-5 Column puhdistus	
Liite 2. HPLC puhdistus ohjelmat	
Liite 3. Puskureiden koostumus Liite Liite	
Liite 4. Antennaleimauksen pitoisuuslaskut	
Liite 5. LA-medium, SB-medium	
Liite 6. Miniprep KIT	
Liite 7. Tiitterimäärityslasku	
Liite 8. Koetinpitoisuuden optimointi, HOOK-efekti	
Liite 9. Herkkyys – koetin 30 nm	
Liite 10. Herkkyys – koetin 10 nm	

KUVAT

Kuva 1. Phage display –sykli	8
Kuva 2. FRET –määrityksen periaate	14
Kuva 3. Stokesin siirtymä	15
Kuva 4. Europiumin fluoresenssin elinikä	16
Kuva 5. Seitsemänhampaisen ioninkantajakelaatin rakenne	17
Kuva 6. Kaksihampaisen antennaligandin rakenne	17
Kuva 7. Oligonukleotidin hybridisaatio	18

KUVIOT

Kuvio 1. Koetinpitoisuuden optimointi	25
Kuvio 2. Hook-efekti	26
Kuvio 3. Herkkyiden analysointi pitoisuudella 30 nM	27
Kuvio 4. Herkkyiden analysointi pitoisuudella 10 nM	27
Kuvio 5. Taustasignaalien vertailu	28
Kuvio 6. Lineaarinen standardisuora	29
Kuvio 7. Lähikuva standardisuora	30
Kuvio 8. Homogeeninen faagitiitterimääritys auttajafaageille	31
Kuvio 9. Homogeeninen faagitiitterimääritys auttajafaageille – lineaarinen alue	31

TAULUKOT

Taulukko 1. Koetinpitoisuuden optimointi	22
--	----

KÄYTETYT LYHENTEET

CFO / ml	Colony forming units / ml rpm
C2-dt	Amino modifioija. Kemiallinen koostumus 5'-Dimethoxytrityl-5-[N-(trifluoroacetylaminoethyl)-3-acrylimido]- 2'-deoxyUridine,3'-[(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)]-phosphoramidite
DES	Dimetyylifumaraatti C ₃ H ₇ NO
dsDNA	Kaksinauhainen DNA (engl. <i>double stranded DNA</i>)
DTPA	Dietyleenitriamiinipentahappo
erbr	Etidiumbromidi
FRET	Fluoresenssin resonanssi energiansiirto
HPLC	High liquid chromatograph
o / n	Yön yli (engl. <i>over night</i>)
PCR	Polymeraasiketjureaktio (eng. <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
ssDNA	Yksinauhainen DNA (engl. <i>single stranded DNA</i>)
rpm	Kierroksia minuutissa (engl. <i>rounds per minute</i>)
TFU / ml	Transforming units / ml
Virioni	Yksi viruspartikkeli

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Turun yliopiston biotekniikan laitoksella ja se liittyi kehitetyn uuden fluoresenssileimateknologian sovelluksen tutkimiseen. Leimateknologia perustuu ajatukseen, että leimamolekyyli koostuu kahdesta osasta, jotka ainoastaan fyysisesti yhteen tuotuna muodostavat aktiivisen leiman. Koska leiman osat yksinään eivät tuota signaalia, voidaan taustasignaalin muodostuminen eliminoida, toisin kuin esimerkiksi ”perinteisissä” fluoressenssiresonanssienergian siirtoon (FRET) perustuvissa määrityksissä. Tämä mahdollistaa erittäin herkkien homogeenisten (erotusvapaiden) määritysten kehittämisen. Menetelmä soveltuu erityisen hyvin nukleiinihappojen pitoisuusmäärityksiin, koska tarvittavat kaksi koetinta voidaan suunnitella tuomaan leiman osat yhteen templaatin (kohde molekyylin) ohjaaman hybridisaation kautta.

Opinnäytetyössä uutta leimateknologiaa pyrittiin soveltamaan filamenttifaagien pitoisuuden mittaukseen. Faagien yksinauhainen-DNA-genomi toimii templaattina, jota mitataan ja jonka pitoisuuden avulla näytteen faagimäärä voidaan päätellä (1 genomi per faagi). Pyrkimyksenä on kehittää erittäin nopea, esim. 10 min kestävä määrittäminen, jota voidaan hyödyntää mm. mitattaessa faagipitoisuuksia faaginäyttötekniikan (phage display) käytön yhteydessä. Menetelmällä on tarkoitus korvata nykyisin käytettävä hidas ja työläs soluinfektioon ja maljaukseen perustuva faagien tiitterimäärittäminen.

1.1 Faaginäyttötekniikka

Faaginäyttötekniikka (*eng. Phage display*) on monikäyttöinen työkalu tutkittaessa proteiinien, peptidien ja pienten ligandimolekyylien kanssakäymistä. Menetelmä käyttää hyväksi bakteriofageja yhdistämällä ne proteiineihin niiden geneettisen informaation perusteella.¹

Menetelmän kehitti vuonna 1985 George P. Smith, ja sitä on myöhemmin sovellettu muun muassa terapeuttisten proteiinien ja vasta-aineiden epitooppia

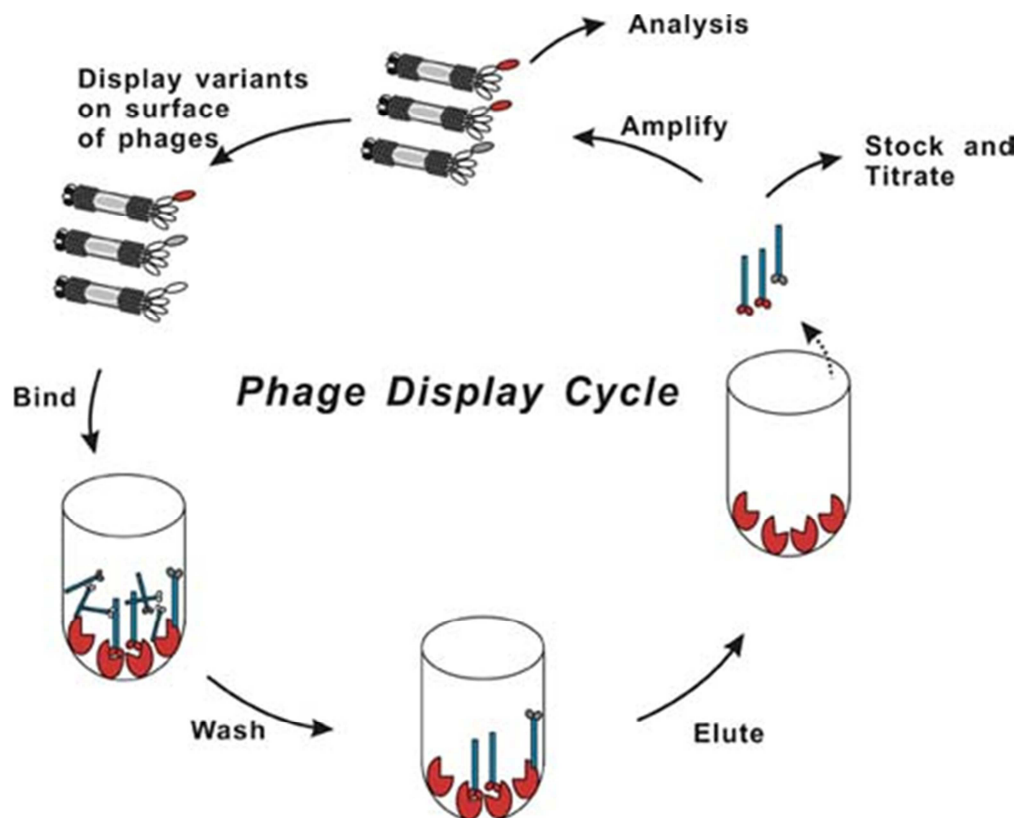
sitovien kohtien kartoittamiseen. Faaginäyttötekniikan idea perustuu faageiksi kutsuttujen virusten kykyyn infektoida bakteerisoluja. Useat vektorit, joita käytetään rekombinantti-DNA-sovelluksissa ovat faageja. Ne infektoivat rekombinantti isäntänä tunnettua bakteeria *Escherichia colia*. Näillä ekspressiovektoreilla on ominaisuus ekspressoita proteiineja vieraassa isännässä eli infektoituessaan isäntäsoluun ne ”ohjelmoivat” sen tuottamaan vierasta peptidiä. Fagemidi on plasmidi, joka sisältää osan faagigenomia, eli se omaa myös filamenttifaagin elementtejä. Näitä elementtejä ovat muun muassa kuoriproteiinigeeni, joka fuusioituu esiteltävän peptidin kanssa, faagin replikaatioalue ja genomien pakkautumiseen tarvittava signaali-alue. Plasmidi pakkautuu faageihin yksinauhaisena. Faaginäyttötekniikkaa voi soveltaa myös kokonaisilla faageilla, joissa peptidi on fuusioitu faagin genomiin eikä auttajafaagia tarvita tuomaan muita faagin proteiineja, toisin kuin fagemidin tapauksessa.²

Faagit siirtävät DNA:nsa solun sisään transduktiossa. Näin se saa solun toimimaan haluamallaan tavalla, ja tuottamaan uusia faagigenomeja. Uudet faagigenomit pakkautuvat proteiini-aiheeseen sisään ja vapautuvat solusta etsimään uusia infektoitavia soluja.³ Rekombinanttiproteiinin koodi on sisällytetty faagigenomiin, joten replikoitumisen tuloksena faagipopulaatio, joka on tuotettu yhdestä kloonista, on feno- ja genotyyppiltään homogeeninen.²

Faaginäyttötekniikka eroaa perinteisestä ilmentämissysteemistä niin, että vierasta geenisekvenssiä on jatkettu yhteen faagin kuoriproteiinin geeniin. Tällöin vieras aminohapposekvenssi on geneettisesti sulautettu endogeenisen kuoriproteiinin aminohappoihin, jotta hybridi-fuusio-proteiini syntyy. Peptidien ominaisuudet eivät tyypillisesti muutu, vaikka ne on liitetty virionin pintaan. Tämä laajentaa faagipeptidien käyttömahdollisuuksia.³ Vektorit, joissa käytetään filamenttifaagia, ovat käytetyimpiä. Yleisimmin käytetty bakteriofagi on M13 –faagivektori.⁴

Faaginäyttökirjasto on heterogeeninen seos edellä mainittuja faagiklooneja, joista jokaisella on yksilöllinen DNA fuusioituna faagin kuoriproteiinin geeniin. Koska faagit vastaanottavat vain yhden geenin modifioinnin yhteydessä,

jokainen kloni ilmentää eri peptidiä. Isäntäbakteerin replikoituessa, se tuottaa suuren joukon faageja, jotka ilmentävät tiettyä peptidiä. Mahdollisen mutaation sattuessa, se periytyy jälkikasvulle ja voi vaikuttaa peptidin ominaisuuksiin.³ Genotyypin yhteys fenotyyppiin mahdollistaa laajojen kirjastojen seulonnan ja rikastamisen in vitro.⁵ Faagikirjastoihin luodaan diversiteettiä tuottamalla tarkoituksellisesti erilaisia peptidivariantteja. Tällä tavoin saadaan rikastettua suunnitelmallisia peptidi- ja proteiinikirjastoja. Tämä mahdollistaa haluttujen spesifisten sitomisominaisuuksien omaavien kloonien eristämisen kirjastosta. Faagikirjastojen peptideillä on siis kaksi vaadittavaa ominaisuutta kemialliseen evoluutioon; replikaatio ja muuttuvuus.³ Faaginäyttötekniikan kirjastojen seulonnan perusidea on esitetty kuvassa 1.



Kuva 1. Phage display –sykli. Kuvassa faaginäyttötekniikan sykli, jolla saadaan seulottua kirjastosta haluttuja peptidejä. Aluksi solut infektoidaan auttajafaagilla. Näiden avulla tuotetaan fagemidi partikkeleja. Sitominen tapahtuu usein

kuoppalevyllä, josta pestään sitoutumattomat fagemidit pois. Kuoppaan sitoutuneet fagemidit eluoidaan ja infektoidaan *E. coliin*. Kasvatuksesta selektoidaan faagilla infektoituneet solut ja amplifikoidaan ne. Lopuksi niistä kasvatetaan bakteerisoluja, jotka sisältävät fagemidi kirjastoja.^{4,6}

Faaginäyttötekniikkaa käytetään useissa sovelluksissa, kuten epitooppien kartoituksessa, uusien reseptorien ja ligandien indentifikaatiossa, epitooppisovelluksissa mm. uusien rokotteiden kehityksessä. Yksi keskeinen sovelluskohde on rekombinanttivasta-ainekirjastot, joista voidaan eristää uusia vasta-aineita ilman koe-eläin immunisointia.⁶

Faaginäyttötekniikka on pyritty kehittämään vuosien saatossa esimerkiksi säätämällä esittelytehokkuutta multi- tai monovalenttiseksi, sekä vähentämällä epäspesifisten faagien rikastumista, muuntamalla ne ei infektiivisiksi.³ Faaginäyttötekniikka on edullinen ja helppo menetelmä toteuttaa. Se käyttää yleisesti tunnettuja mikrobiologisia tekniikoita ja sen pääresurssit faagikirjastot ja kloonit ovat replikoitavissa, joka tekee siitä monikäyttöisen.³ Faaginäyttötekniikan etuihin voidaan myös lukea suurien kloonimäärien seulonta ($>10^9$), faagien tehokas ja helppo monistaminen *E. coliin* avulla, sekä tietämys sen käyttömahdollisuuksista edellämainituissa sovelluksissa.⁶

1.2 Faagien kvantifointimenetelmät

Faaginäyttötekniikan yhteydessä on tarve mitata eluoitujen faagien määrää.

1.2.1 Tiitterimääritys

Plakkimääritys perustuu siihen että jokainen pesäke vastaa yhtä bakteeria. Vaikka bakteeri sisältää lukuisia virusgenomeja, edustaa yksi bakteeri yhtä faagia, joka infektoi bakteerin viljelmän alussa. Infektio leviää, kun virus lisääntyy ja tuottaa lopulta näkyvän plakin. Plakki on konfluenttiin bakteerikasvustoon tullut läikkä, kun ko. kohdassa lisääntyvä faagi hidastaa solujen kasvua. Pesäke puolestaan on antibioottimallilla kasvava resistentti

bakteeripesäke. Se kasvaa koska faagi, joka kantaa resistenssigeeniä on infektoinut solun, josta pesäke on syntynyt.

Faagitiitteri määritellään laskemalla muodostuvien plakkien tai pesäkkeiden lukumäärää ja vertaamalla sitä suspension tilavuuteen. Faagitiitteri ilmoitetaan yksiköllä PFU (plaque forming units) / ml tai CFO (colony forming units) / ml.⁷

Plakkimenetelmä on perinteinen menetelmä bakteriofaagien määrälliseen laskemiseen. Valitettavasti tämä metodi on hidas, työläs ja tulokset voivat olla epätarkkoja. Menetelmä vaatii ainakin noin 5 tunnin mittaisen työrupeaman, sen lisäksi tuloksen saaminen kestää ainakin 1,5 vuorokautta. Reagenssien ja välineiden lukumäärä, sekä pieni dynaaminen alue, joilla tulosten arviointi tulisi tapahtua hankaloittavat menetelmän toteutusta. Ympäristön vaikutus bakteerikasvuun on otettava huomioon, mahdollinen kuivuminen tai ikääntyminen voi vaikuttaa tulokseen laskien faagitiheyttä. Isäntäbakteerin alhainen viabiliteetti, vaikuttaa laskevasti todelliseen tiitteriin, sen ollessa alle 100 %. Mahdolliset havaintovirheet laskiessa pesäkkeitä maljoilta, ja virheet toistettavuudessa, voivat häiriintyä lukuisten laimennusten ja pipetointien takia.⁸ Tiitterimäärityksen ongelmat motivoivat opinnäytetyön menetelmän kehittämisessä.

1.2.2 Absorbanssimenetelmä

Absorbtio menetelmä on absorbanssiarvoon perustuva mittaamenetelmä, jolla voidaan määrittää fyysinen partikkelikonsentraatio. Pallomaisella faagilla on suurin piirtein yhtä suuri painosuhde proteiinin ja DNA:n välillä. Filamenttifaagilla on kuusi kertaa enemmän proteiinia kuin DNA:ta. Tämän takia proteiini vaikuttaa olennaisesti absorbtiospektriin absorboimalla vahvasti välillä 260-280 nm, niin että maksimi osuu 269 nm kohdalle. Tehtyjen mittauksien perusteella [Day, L.A. ja Wiseman, R.L. (1978)] faagien konsentraation voi laskea muodossa virioni/ml absorptioarvoista väliltä A₂₆₉ ja A₃₂₀ alla olevan kaavan avulla:

$$\text{virioni/ml} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \cdot 6 \times 10^{16}}{\text{virionien lukumäärä/alusta}}$$

Kaavassa virionien määrä millilitraa kohden saadaan kertomalla absorbanssien erotus välillä 269-320 nm $6 \cdot 10^{16}$:sta ja jakamalla virionien lukumäärällä yhtä alustaa kohden. Vähentämällä absorbanssin aallonpituudella A320, jossa faagin DNA absorboi, saadaan korjattua karkeasti faagipartikkeleista siroava valo ja muista komponenteista. Korjaus on karkea, ja hankalan absorbanssimenetelmästä tekee se, että liuoksen on oltava suhteellisen puhdas.⁹

1.2.3 qPCR

Polymeraasiketjureaktiotekniikka (PCR, *engl. polymerase chain reaction*) on kehitetty monistamaan DNA-jaksoja. Se on hyvin herkkä tekniikka ja mahdollistaa tiettyjen DNA alueiden monistuksen hyvin pienestäkin määrästä näytettä.¹⁰

Kvantitatiivista PCR (qPCR) tekniikkaa on olemassa kahta sovellusta, absoluuttinen ja suhteellinen. Absoluuttinen kvantitatiivinen PCR mittaa nukleiinihappojen määrää kohteessa. Se on tarkka sovellus, toisin kuin suhteellinen kvantitatiivinen PCR, joka mittaa nukleiinihappojen suhteita näytteestä.¹¹ Kvantitatiivinen PCR on herkkä ja spesifinen määrittämenetelmä faagiklooneille ja sen tuloksia voidaan verrata tiitterimäärittäksiin. Kuitenkin opinnäytetyössä tutkittuun homogeeniseen faagitiitterimäärittäykseen verrattuna, kvantitatiivinen PCR on hitaampi ja monimutkaisempi tekniikka.¹⁰

1.2.4 Hybridisaatiomäärittäys

Hybridisaatio on kahden yksijuosteisen DNA:n yhteen liittymistä niille myönteisissä olosuhteissa. Tämä edellyttää vastinnauhojen komplementaarisuutta, eli että ne sopivat toisilleen vastinemästensä puolesta (G-C ja A-T). Yksinauhaisista juosteista toinen voi olla leimattu esim. fluoresoivalla leimalla. Koettimen ja kohde DNA:n kompleksia kutsutaan

hybridiksi. Näin ollen kompleksi voidaan havaita fluoresenssin avulla. Hybridi voi koostua kahdesta DNA tai RNA molekyylistä, tai molemmista.

Hybridisaation DNA nauhat irrotetaan toisistaan katkaisemalla vetysidokset altistamalla ne lämmölle tai emäksisille olosuhteille. Tapahtuma on reversiibeli eli palautuva, jolloin komplementaariset DNA nauhat palautuvat yhteen, kun liuos jäähtyy hitaasti.¹³

Kvantitatiinen hybridisaatiomääritys tehdään tyypillisesti niin, että kohdetta vastaan on kaksi eri kohtiin sitoutuvaa koetinta. Toinen on leimattu, eli se tuottaa detektoitavan signaalin ja toinen mahdollistaa immobilisaation kiintokantaja pintaan, tyypillisesti mikrotiiterilevyn kaivoon. Immobilisoiva koetin voi olla suoraan kiinnitetty kaivoon tai se voi olla esim. biotinyloituja, jolloin hybridisaatiossa muodostunut kompleksi voidaan kiinnittää strepavidiinipäälyllystettyyn kaivoon.¹² Epäspesifisesti sitoutuneet juosteen saadaan pestyä pois, jonka jälkeen sopivalla detektiomenetelmällä saadaan mitattua leimaa.^{13 s. 114}

1.3 Fluoresoivat leimat

Atomit ja molekyylit absorboivat niihin kohdistettua eksitaatiovaloa, eli fotoneja, niille ominaisella aallonpituudella, tätä tapahtumaa kutsutaan eksitaatioksi. Emissio on eksitaatiolle käänteinen tapahtuma, jossa atomi pienen ajan hetken kuluttua säteilee valoa tietyllä aallonpituudella.^{14 s.1-2}

Jotkin proteiinit ja pienet molekyylit ovat luonnostaan fluoresoivia, mutta esimerkiksi nukleiinihapot, lipidit tai monet pienet molekyylit eivät omaa tällaista kykyä, siksi niitä voidaan leimata fluoroforeilla. Fluoresoivia leimatekniikoita ja niiden sovelluksia on lukuisia, kuten esimerkiksi Fluoresenssi resonanssienergien siirto FRET (kts. kappale 1.3.2)

Fluoresoiva leima (fluorofori) kiinnitetään kovalenttisesti haluttuun molekyyliin eli koettimeen. Niitä käytetään usein molekyylien detektioon fluoresoivien mikroskooppien, tai muiden fluoresenssia lukevien laitteiden avulla.¹⁵

Europium (Eu), Terbium (Tb), Samarium (Sm) ja Dysprosium (Dy) ovat harvinaisia maametalleja eli lantanideja. Niille ominaista on pitkäikäinen ja voimakas fluoresenssi, mutta ne eivät sovi yksinään fluoresenssileimauksiin niiden pienen molaarisen absorptiokertoimen vuoksi. Kun lantanidi yhdistetään kelaatin kanssa muodostavat ne yhdessä orgaanisen kompleksin, jolloin niiden molaarinen absorptiokerroin paranee ja ne sopivat fluoresoiviksi leimoiksi. Lantanidi ei tyypillisesti vaikuta leimatun aineen ominaisuuksiin.¹⁶

1.3.1 Nukleiinihappojen detektio

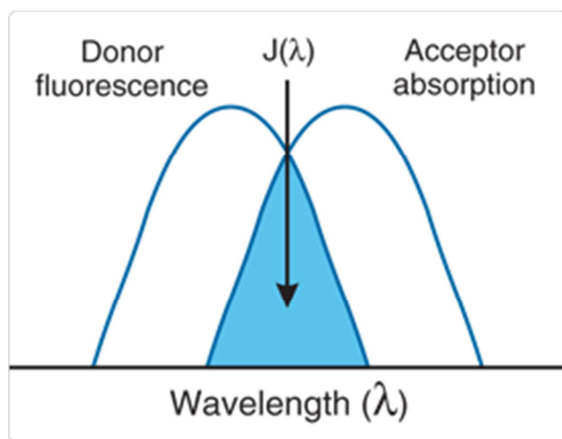
Ensimmäiset käytetyt nukleiinihappojen detektiomenetelmät perustuivat radioaktiivisten leimojen käyttöön. Radioaktiivinen leima kiinnitettiin koetimeen, jotka tuottivat esim. radiografilla havaittavaa signaalia. Näiden koettimien huono puoli piilee niiden radioaktiivisuudessa, joka aiheuttaa vaaratilanteita huonosti käsiteltynä ja jätteenkäsittelyn kustannuksissa. Jätteenkäsittelyllä pyritään estämään radioaktiivisten aineiden leviäminen ympäristöön ja jätteiden joutuminen asiattomien käsiin.¹⁷ Toisaalta radioaktiiviset leimat ovat vakaita ja määrällisesti tarkkoja. Kuitenkin muut detektiomenetelmät, ovat korvanneet radioisotooppisten leimojen käyttöä.^{18 s. 17–18}

Ei-radioaktiiviset detektiomenetelmät perustuvat DNA:n suoraan leimaamiseen fluorofooreilla ja entsyymeillä, tai epäsuoraan detektioon, jossa detektoiva aine (reporter group) on kiinnittyneenä DNA koetimeen. Fluorokromeilla leimatut DNA koettimet eivät ole tarpeeksi herkkiä. Entsyymileimat taas voivat inaktivoitua kovissa hybridisaatio olosuhteissa. Immunoleimat, jotka on liitetty hybridisoitaviin sekvensseihin, voivat estää hybridisaatioreaktion. Vasta-aineiden epäspesifinen sitoutuminen usein tuottaa suurta taustasignaalia.¹⁹

1.3.2 Fluoresenssi resonanssienergian siirto FRET

Fluoresenssi resonanssienergian siirto (FRET, *engl. Fluorescence resonance energy transfer*) perustuu kahden fluoroforin, joista toinen toimii donorina ja toinen akseptorina, vuorovaikutukseen. Kun akseptorin eksitaatioaallonpituus ja donorin emissioaallonpituus ovat fyysisesti lähellä toisiaan (kuva 2), donori

luovuttaa viritystilansa energian akseptorille. Akseptori virittyy ja emittoi valoa sille ominaisella aallonpituudella. Teknologian tehokkuus on kääntäen verrannollinen donori- ja akseptorifluoroforien välisen etäisyyden kuudenteen potenssiin.



Kuva 2. FRET –määrityksen periaate. Donorin eksitaatioaallonpituus ja akseptorin emissioaallonpituus ovat fyysisesti päällekkäin.²⁰

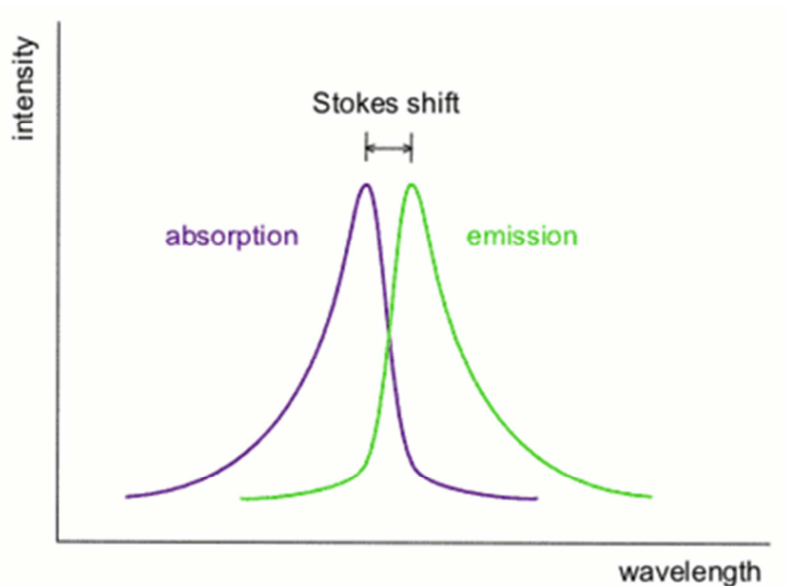
Lyhytikäisten fluoroforien välinen FRET on liian epäherkkä leimatekniikka useimpiin immunomääritysovelluksiin. Jos donorina käytetään pitkäikäistä fluoroforia (lantanidikelaatit), voidaan myös akseptorin emissio mitata aikaerotteisesti. Tällöin määritykset herkistyvät huomattavasti.²¹

FRET -määritysten suurena etuna on myös se, että ne voidaan tehdä homogeenisesti. Heterogeenisiin määrityksiin verrattuna homogeeniset määritykset ovat yksinkertaisempia, nopeampia, sekä pesu- ja erotusvaiheiden pois jäämisen myötä kontaminaatoriski pienenee huomattavasti.²²

1.3.3 Aikaerotteinen lantanidikelaattileimojen fluoresenssi

Aikaerotteisella fluoresenssilla (engl. *time resolved fluorometry*) tarkoitetaan lantanidikelaatin (tässä Eu^{3+}) pitkäaikaisen fluoresenssin mittausta viiveajan jälkeen, jolloin näytteen taustafluoresenssi on jo sammunut. Lisäksi lantanideilla on kapeat emissiopiikit ja ero eksitaatio- ja emissioaallonpituuksien välillä on

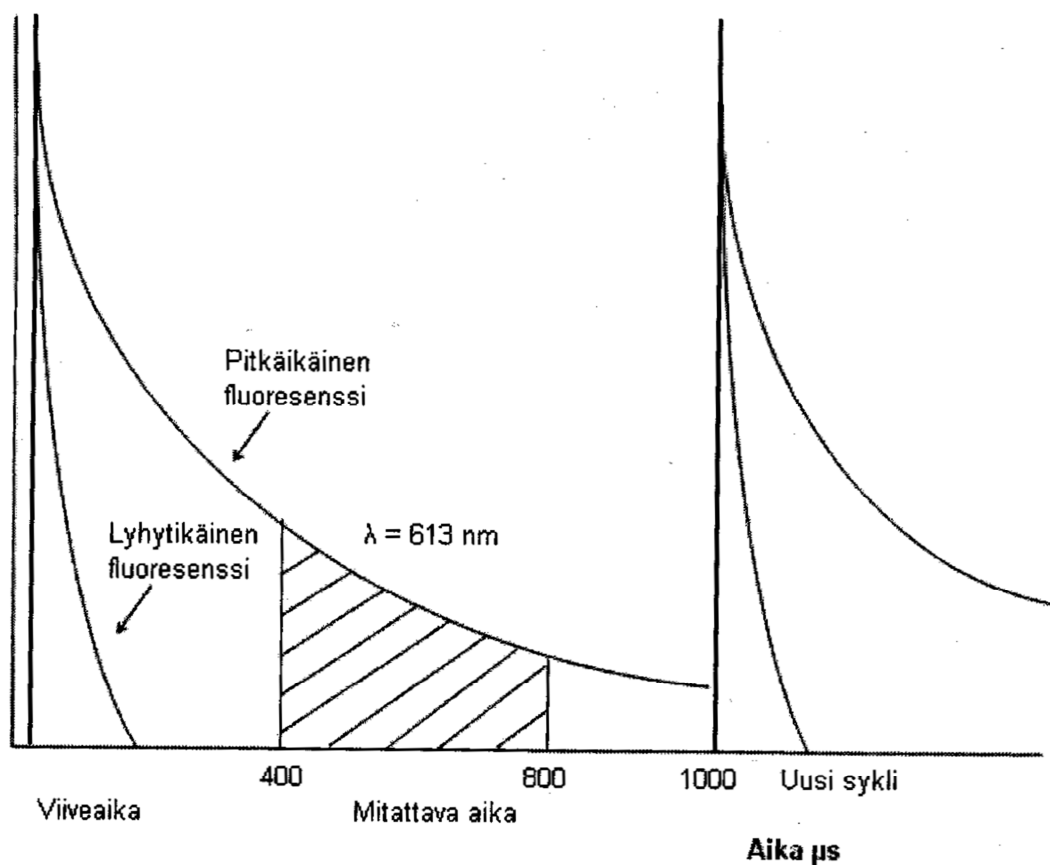
suuri, mikä lisää herkkyyttä ja auttaa erottamaan lantanidikelaatit taustasignaalista.²⁰ Eroa absorptio ja emissio maksimin välillä kutsutaan stokesin siirtymäksi. Siirtymä aiheutuu viritystilan takia purkautuvan valokvantin ja viritystilan aiheuttaneen valokvantin energia eroista. Kun purkautuvan valokvantin energia on pienempi, aiheuttaa se samalla sen että emissio aallonpituus on pidempi kuin absorptioaallonpituus. Pitkä stokesin siirtymä parantaa fluoresenssitekniikoiden herkkyyttä. Se helpottaa erottamaan emissiofotonit matalaa taustaa vasten ja erottamaan ne viritysfotoneista.²³ (kuva 3).



Kuva 3. Stokesin siirtymä. Stokesin siirtymällä tarkoitetaan eroa eksitaatio – ja emissioaallonpituuksien välillä.²⁴

Pitkäaikaisena fluoroforina europiumkelaatti virittyy aallonpituudella 340 nm ja emissio tapahtuu aallonpituudella 615 nm. Europiumin fluoresenssin elinikä (noin yksin millisekunti) on pitkä verrattuina muihin fluoresenssiyhdisteisiin (muutamia nanosekunteja).¹⁶ Aikaerotteinen fluoresenssin periaate kuvattu kuvassa 4.

Viritys $\lambda = 340 \text{ nm}$

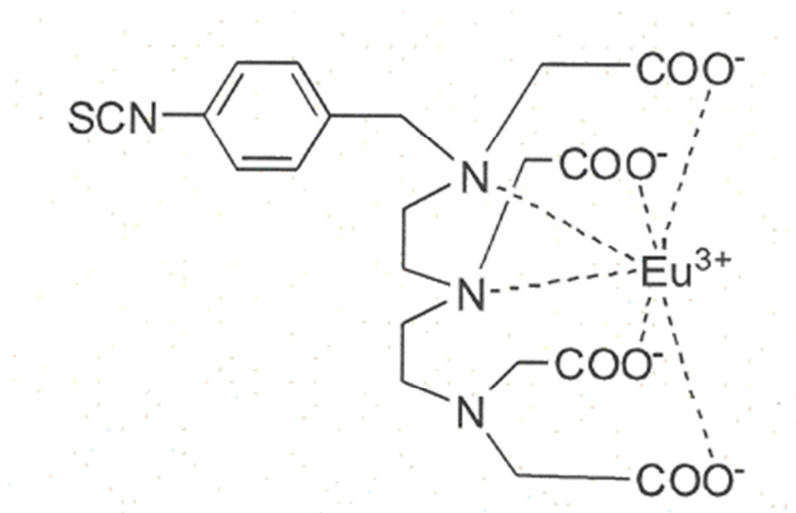


Kuva 4. Europiumin fluoresenssin elinikä. Europium fluoresenssin elinikä on noin yksi millisekunti. Itse mittaus näytteestä tapahtuu 400-800 μs eksitaatiopulssista, jolloin muiden kuin europiumkelaatin tuottama fluoresenssi on emittoitunut. Mittaus sykli kestää kokonaisuudessaan 1000 μs ja tämä sykli toistetaan 1000 kertaa, jolloin mittauksen kokonaiskesto on 1 sekunti.¹⁶

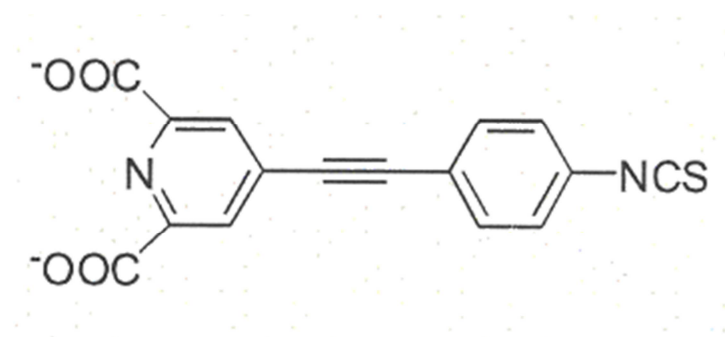
1.3.4 Lantanidikelaattien komplementaatiotekniikka

Lantanidikelaatteja on myös käytetty donoreina etäisyydestä riippuvassa resonanssi energian siirrossa. Myös näissä homogeenisissä määityksissä havaitaan donorin ja akseptorin keskinäishäiriötä, eli donorin emissiosignaalia havaitaan myös akseptorin mittausikkunassa. Tästä aiheutuva taustasignaalin nousu heikentää määitysten herkkyyttä.

Ongelma voidaan ratkaista jakamalla fluoresoiva lantanidikelaatti kahteen osaan; ei fluoresoivaan ioninkantajakelaattiin ja valoa keräävään antennaligandiin. Molekyylin osat on suunniteltu niin että lantanidi-ioni (Eu^{3+}) koordinoidaan vahvasti kantajaligandiin seitsemän hampaisella ionin kantajakelaatilla, (kuva 5) jättäen kolme koordinoivaa kohtaa vapaaksi täydentävää kaksihampaista antennaligandia varten (kuva 6).²⁵



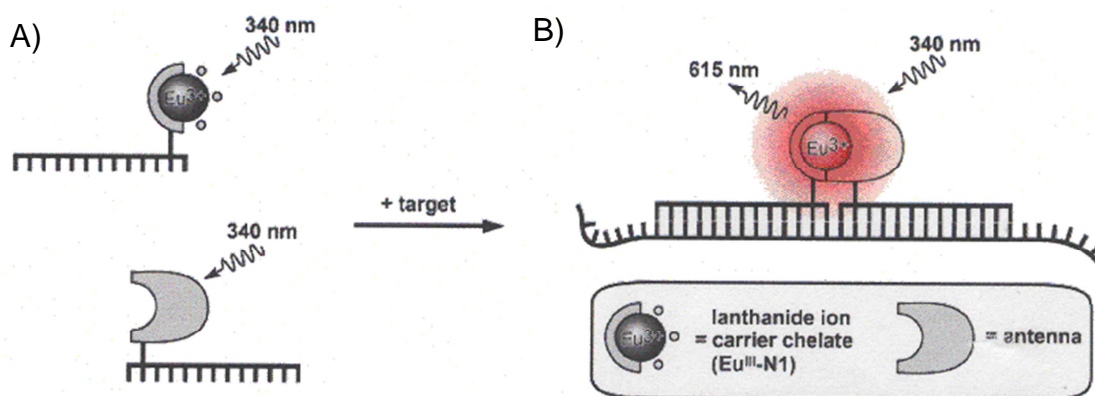
Kuva 5 Seitsemänhampaisen ioninkantajakelaatin rakenne $[\text{N}^1\text{-(4-isothiocyanatobenzyl)diethylenetriamine-N}^1, \text{N}^2, \text{N}^3, \text{N}^3]^-$ – tetrakis(aceto)europium(III)].²⁵



Kuva 6 Kaksihampaisen antennaligandin rakenne 4-((4-isothiocyanatophenyl)ethynyl)pyridine-2,6-dicarboxylic acid.²⁵

Tämä homogeenin hybridisaatiomenetelmä oli alun perin esitelty Oserin ja Valten toimesta (1990), mutta heidän sovelluksen tausta-signaalisuhde jäi alle kolmeen.²⁶

Hybridisaatiomenetelmän periaate kuvataan kuvassa 7. Kaksi 16-meeristä oligonukleotidikoetinta, jotka on leimattu A) kantaja lantanidikelaatilla Eu^{3+} -N1 ja B) valoa keräävällä antennaligandilla, hybridisoidaan 32-meeriseen oligonukleotidiin. Sekä kantajalantanidikelaatti, että antenna-ligandiin on kiinnitetty aminomodifioituun tymiiniemäkseen, joka sijaitsee yhden nukleotidin päässä oligonukleotidin 3' (kantajakelaatti) ja antennalla 5' (antennaligandi) -päästä. Kantajakelaatin ja antennaligandin keskinäinen molekyylien välinen sidosaaffiniteetti on pieni, eikä fluoresenssi ole havaittava ilman kohde DNA:n läsnäoloa. Kun kompleksi muodostuu, syntyy viritettäessä pitkäikäistä fluoresoivaa valoa.²⁵ Hybridisaatiotekniikan periaate on kuvattu kuvassa 7.



Kuva 7 Oligonukleotidin hybridisaatio. Havainnollistettu kuva oligonukleotidi hybridisaatiosta suoralla lantanidikelaatin komplementaatiomenetelmällä. A) Ilman kohde DNA:ta koetin Eu^{3+} -N1 ja antennaligandi eivät fluoresoi. B) Kohde-oligonukleotidi indusoi korkeasti fluoresoivan kelaattikompleksin, jota viritetään aallonpituudella 340 nm ja pitkäikäisen fluoresenssinsa ansiosta emittoidaan 615 mn.²⁵

1.4 Työn tarkoitus

Opinnäytetyön tarkoitus oli tutkia lantanidikelaattikomplementaatiotekniikan soveltamista filamenttifaagien pitoisuuden mittaukseen. Työssä käytettiin kahta erilaista Eu-antenna-aluketta. Ensimmäinen aluke oli suunniteltu niin, että emäsmodifikaatio C2-dt on toisessa emäksessä, 3' päästä lukien, niin että leima ja europium-kelaatti ovat likimain kosketuksissa toisiinsa, kun ne hybridisoituvat alukkeeseen. Antennamodifikaatio kaksi eroaa modifikaatiosta yksi siinä määrin, että emäsmodifikaatio C2-dt on kolmannessa emäksessä, ja näin ollen hieman kauempana hybridisaation yhteydessä.

Työssä käytettiin mallina VCMS13 auttajafilamenttifaagia ja koettimet oli suunniteltu sitoutumaan sen kanamysiiniresistenssigeeniin. Työssä käytetyn faagin genomin koko on 8669 emäsparia (bp). Menetelmän reagenssit kestävät kuumennuksen.

2 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1 Europium kelaatti

Eu-kelaatilla leimattiin oligonukleotidialuketta, jonka sekvenssi oli 5'-AGA TGA GAT GGT CAG ACT AAA C(C6)TG-3' (Sigma-Aldrich, St. Louis MI). Kelaattikoetin leimattiin *[N¹-(4-isothiocyanatobenzyl)diethylenetriamine-N¹,N²,N³,N³tetrakis(aceto)europiumilla](Eu^{III}-N1)* ja luonnostaan fluoresoivalla *[2,2',2'',2'''-[[4-[(4-isothiocyanatophenyl)ethyl]pyridine-2,6-diyl]bis(methylenenitrilo)]tetrakis(acetato)-europium(III)](Eu^{III}-7d)*.

Eu-kelaatin aluke (kan1compl., Thermo Scientific) (18,7 nmol) leimattiin JR/XIV/8 – sykliellä 7d Eu-kelaatilla. Kelaattia punnittiin 3,2 mg, 50 µl:aan H₂O:ta. Tätä seosta pipetoitiin 1 µl, 50 µl:aan 50 M:sta HCL:ää. Suspensiota inkuboitii +37 °C 30 minuutin ajan.

Leimaus puhdistettiin ylimääräisestä ja irtonaisesta leimasta NAP-5 puhdistuskolonnin avulla (liite 1), jonka puhdistus perustuu geelisuodatukseen. Kuivaus tehtiin Hetovac ilmakeivaimella yön yli. Ylimääräinen leima puhdistettiin vielä tarkemmin reaktiosta HPLC:n avulla. Puhdistus suoritettiin ODS C18 Hypersil kolonnilla. HPLC puhdistusohjelma liitteenä 2.

Leimafraktiot kuivattiin Hetovac ilmakeivaimella yön yli. EU-kelaatti puhdistettiin vielä toisen kerran HPLC:n avulla. Näin pyrittiin vähentämään taustasignaalin muodostumisesta, kun ylimääräisen leimautumattoman kelaatin osuus pienenee. Kuivatut leimafraktiot liuotettiin 50 µl 10 * oligon säilytyspuskuriin (koostumus liitteenä 3) ja mitattiin pitoisuudet nanodrop – spektrofotometrillä ohjelmalla UV-vis.

2.2 Europium Antenna – modifikaatio 1

Antennan leimaukseen käytettiin oligonukleotidia, jonka sekvenssi oli 5'-C(C2dT)G ACG GAA TTT AGT CCT CTT-3' (Sigma-Aldrich, St. Louis MI). Leimauksessa käytettiin 4-(isothiocyanaatophenyl)pyridine-2,6-dicarboxylic happoa (antenna) yhdessä aminomodifioitujen tyymiinien kanssa.

Eu-antennankoetin (kan2compl. Thermo Scientific) (27,4 nmol) leimattiin antenna merkkiaineella. Europium antenna merkkiainetta punnittiin 2,6 mg ja liuotettiin se 350 µl dimetyylifumaraattia (DMF). Suspensio vorteksoitiin ja sonikoitiin sekaisin ja inkuboitiin 30 minuuttia +50 °C.

Liuoksen antennapitoisuudeksi saatiin laskemalla 20 mM (laskut liite 4). Leimausreaktio valmistettiin lisäämällä Eu-antennaa 50-kertainen ylimääräoligonukleotidiin nähden. Lisäksi lisättiin 1,25 * karbonaattipuskureita Na₂CO₃ ja NaHCO₃ (liite 3). Leimausreaktio sonikoitiin ja inkuboitiin ravistelussa +50 °C yön yli.

Eu-antenna puhdistettiin NAP-5 kolumnilla ja HPLC:llä ylimääräisestä leimasta (ohjelma liitteenä 2). Kromatografisessa puhdistuksessa Eu-antennafraktiot pystyttiin tunnistamaan nousevasta UV -detektorin signaalista. Fraktioiden pitoisuudet mitattiin nanodrop spektrofotometrillä ohjelmalla UV-vis ja laskettiin oikeat pitoisuudet korjauskertoimen avulla.

2.3 Europium antenna – modifikaatio 2

Antennan oligonukleotidin sekvenssi oli 5'- TGA CGG AAT TTA TGC CTC TTC C-3' (the biopolymer factory). Aluke (62,6 nmol) leimattiin ja puhdistettiin samaan tapaan kuin modifikaatio 1. Leimauksen pitoisuusylimäärää nostettiin 100 -kertaiseksi. Näin saatiin saantomäärät nousemaan.

2.4 Faagitiitterin määrittäminen infektiivisyyden perusteella

Infektiomenetelmällä voidaan mitata infektiivisten faagien lukumäärää. *Escherichia coli* –soluja infektoidaan faagilaimennoksilla ja solut maljataan maljoille. Maljoilla oleva antibiootti varmistaa sen, että vain infektoituneet solut kykenevät kasvamaan. Kasvaneiden pesäkkeiden ja laimennosten perusteella lasketaan tiitteri (tfu/ml)²⁷.

LA-maljat valmistettiin liitteen 5 ohjeiden mukaan. SB –mediumiin (liite 5) 20 ml lisättiin 10 mg/ml tetrasykliiniä, sekä glukoosia 0,2 % ja noin 500 µl *Escherichia coli* XL-1 Blue – soluja. Soluja kasvatettiin +37 °C 300 rpm OD₆₀₀ 0,38 sakka. Valmistettiin kolme rinnakkaisnäytettä 10⁻⁷, 10⁻⁸ ja 10⁻⁹ VCS M13 –helper-faagista ja SB -mediumista. Lisättiin 100 µl solukasvatusta ja 20 µl laimennoksia esilämmitettyihin eppendorfputkiin (+37 °C). Sekoitettiin pipetillä varoen ja annettiin inkuboitua +37 °C, 30 minuuttia. Laimennokset pipetoitiin maljoille (kan 50 µg/ml + TET 10 µg/ml + glukoosi 0,5 %) ja levitettiin levityssauvalla. Kasvatettiin myös infektiomalja (kloroform, tetrasykliini, glukoosi) ja valmistettiin nolla malja, johon pipetoitiin 120 µl pelkkiä soluja, ilman VCS MB –faagivektoria. Kasvatettiin +37 °C o/n.

Solukasvatuksen loppuun (17 ml) lisättiin 50 µl VCS M13 – helper-faagista, inkuboituihin 30 minuuttia +37 °C ja tunnin ajan 300 rpm +37 °C. Inkubointien jälkeen lisättiin kasvatukseen 50 µg/ml kanamysiiniä (50 mg/ml) eli 17 µl ja kasvatettiin +37 °C, 300 rpm yön yli.

Yön yli kasvanutta solukasvatusta sentrifugoitiin 10 minuuttia +4 °C, 4000 x g. Käsiteltiin pelletti Miniprep Kit:llä (liite 6), niin että DNA saadaan erotettua.

ssDNA-pitoisuudet mitattiin nanodrop spektrofotometrillä ohjelmalla Nucleic Acids (sample type ssDNA-33).

Yön yli kasvaneet pesäkkeet lasketaan maljoilta. Tiitteriksi saadaan laskemalla $6,98 \cdot 10^{14}$ kpl/l (laskut liitteenä 7). Toistetaan tiitterimääritys, uudeksi tiitteriksi saadaan $6,0 \cdot 10^{14}$ kpl/l.

2.5 Koetinpitoisuuden optimointi

Koetinpitoisuus optimoitiin, tarkoituksena löytää osuhteet, joissa signaali/taustasuhde on mahdollisimman suuri ja käyttökelpoinen signaalialue laaja. Optimoitiin probipitoisuus niin, että muutettiin templaattipitoisuuksia 0-100 pM verrattuna koetinpitoisuuksiin 0-30 nM taulukon 1 mukaan. Tämän suurempiin probipitoisuuksiin ei menty, koska se ei olisi taloudellisesti, eikä kokeellisesti järkevää.

Taulukko 1. Koetinpitoisuuden optimointi

koetin nM	0	0	0	0
templ pM	0	0,1	10	100
koetin nM	1	1	1	1
templ pM	0	0,6	6	6
koetin nM	5	5	5	5
templ pM	0	1	10	100
koetin nM	15	15	15	15
templ pM	0	1	11	113
koetin nM	30	30	30	30
templ pM	0	1	11	114

2.6 Koettimen herkkyysanalyysi

Määrityksen herkkyys ilmoittaa pienimmän luotettavasti havaittavissa olevan näytepitoisuuden. Herkkyysanalyysi suoritettiin kahdella koetinpitoisuudella 30 nm ja 10 nm, kun taas templaattien pitoisuutta vaihdeltiin välillä 0-1000 pm

(0, 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10, 30, 100, 300, 1000). Molemmat koetinpitoisuudet optimoitiin erikseen. Testillä voidaan laskea analyttinen herkkyys, joka ilmaisee toteamisrajan (detektorajan) eli templaatin pienimmän havaittavan määrän, joka voidaan osoittaa tarkasti.

2.7 Tausta signaalivertailu

Taustasignaalia vertailtiin samoilla koetinpitoisuuksilla, kuin herkkyyttä (10 ja 30 nm).

2.8 Auttajafaagien tuotto

Tuotetaan helper faageja *E. coli* XL-1 blue –soluilla. Tuotto aloitettiin kasvattamalla *E. coli* XL-1 blue – soluja 5 ml SB-mediumia (koostumus liitteenä 7) + 1 % glukoosia, + 10 µl/ml tetasykliiniä, 5mM MgCl₂, 300 rpm ja +37 °C. Solujen annettiin kasvaa OD₆₀₀0,5 saakka. Tämän jälkeen joukkoon sekoitettiin 2*10¹⁰ tfu/ml VCS M13 – helper faageja (10 kertainen määrä soluihin nähden). Soluliuksen annettiin inkuboitua +37 °C, 30 minuuttia. Infektoidut solut siirrettiin 20 ml:aan esilämmitettyä SB-mediumia + 1 % glukoosia, + 10 µl/ml tetasykliiniä, 5 mM MgCl₂ ja annettiin inkuboitua 300 rpm, +37 °C, tunnin ajan. Lisättiin 70 µl/ml kanamysiini antibiottiresistenssin aikaansaamiseksi. Kasvatus jätettiin 300 rpm, +37 °C yön yli.

Solut sentrifugoitiin pohjaan (+4 °C, 2000 rpm, 20 min) ja erotettiin supernatantti, johon solut ovat tuottaneet faagit. Tehtiin aiemmin käytetyistä ja testatuista faageista standardisuora immunomäärityksen avulla.

2.9 Kasvatetun auttajafaagin pitoisuus

Määritetään kasvatetun helperfaagin pitoisuus, niin että probipitoisuus pidetään 30 nm, muuttaen templaattipitoisuutta 0-300 nm välillä (0, 0,3; 1,0; 3,0; 10, 30, 100, 300). Kasvatettua helperfaagistockia mitataan määrät, jotka oletetaan osuvan standardisuoralle eli 5,0 µl ja 10,0 µl.

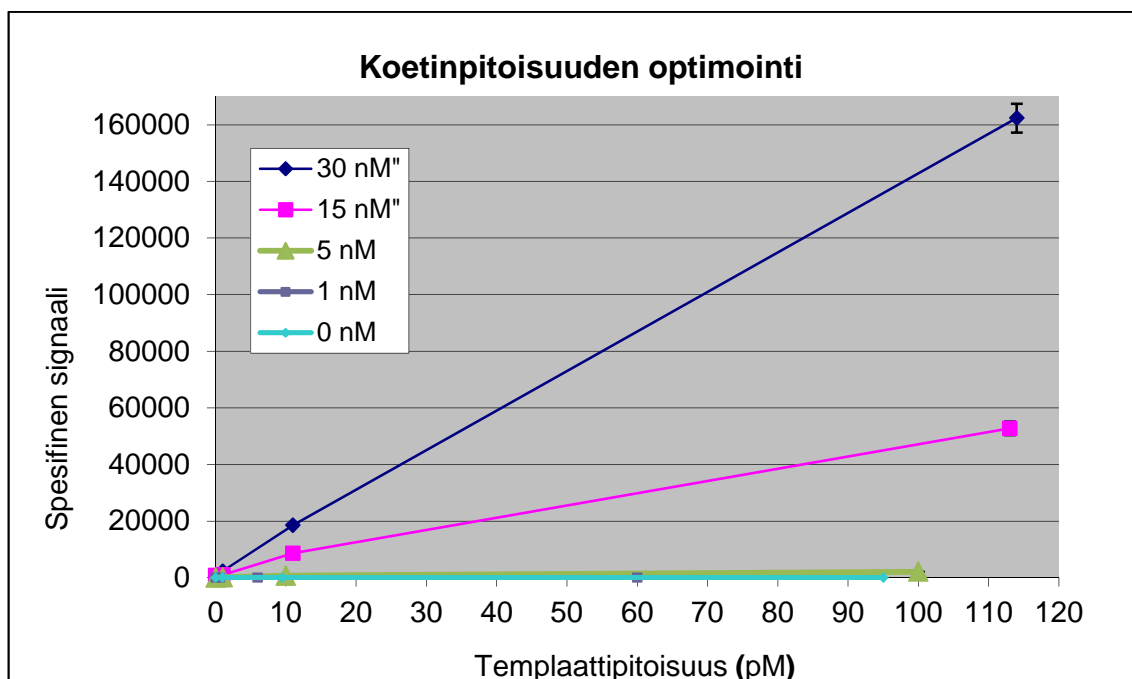
2.10 Homogeeninen tiitterimääritys kasvatetuille helperfaageille

Tehtiin kokeellinen homogeeninen tiitterimääritys helperfaageille.

3 TULOKSET JA ANALYSOINTI

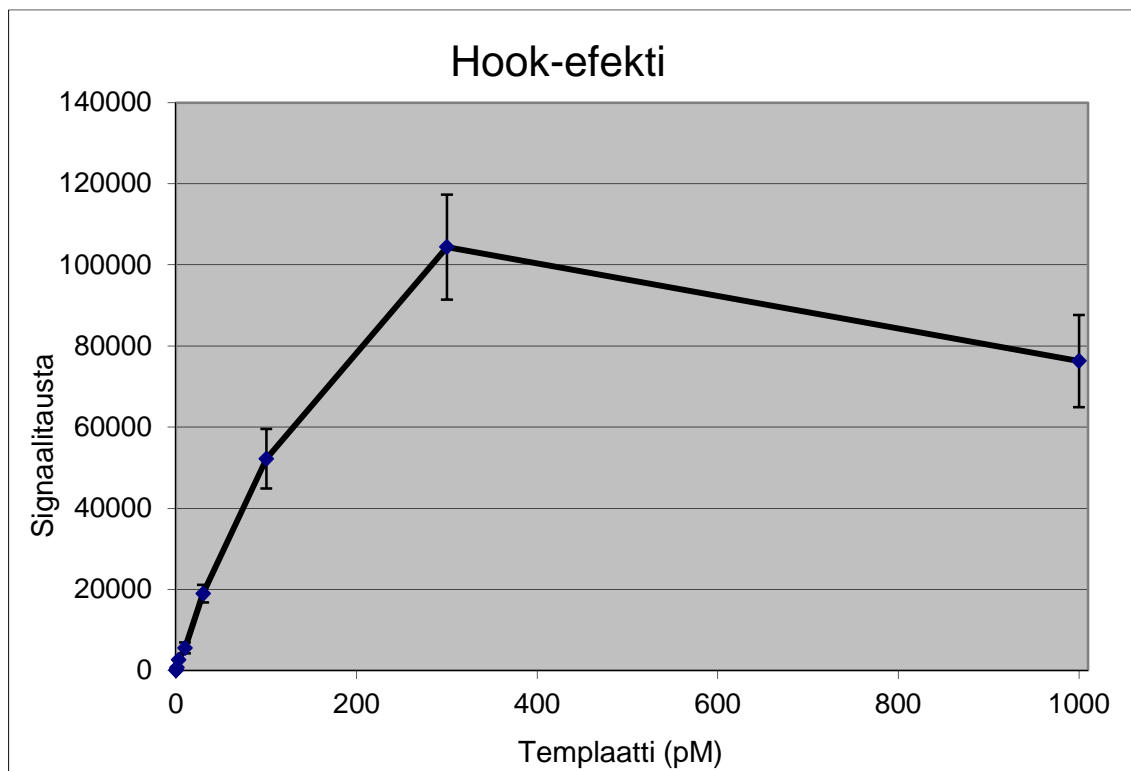
3.1 Koetinpitoisuuden optimointi

Koetinpitoisuuden optimointi avulla selvitettiin kokeellisesti järkevät olosuhteet. Kuviosta 1 voidaan nähdä, että pitoisuudet 1 nM ja 5 nM eivät juuri eroa nollassa. Pitoisuudessa 30 nM saadaan korkein spesifinen signaali ja systeemi toimii, niin etteivät taustasignaalit vielä nouse ongelmaksi. Yli 30 nM jälkeen laskettiin koettimen kulutuksen jo nousevan liian suureksi. Konsentraatiot kuvaavat molempien koettimien, sekä antenna- että ionikantajan, pitoisuuksia reaktiossa. Templaatti pitoisuutta nostettiin taulukon 1 mukaan välillä 0; 0,1; 10; 100. Kuvan 8 arvoista on vähennetty nollasignaali eli tausta (arvot liite 8).



Kuvio 1. Koetinpitoisuuden optimointi.

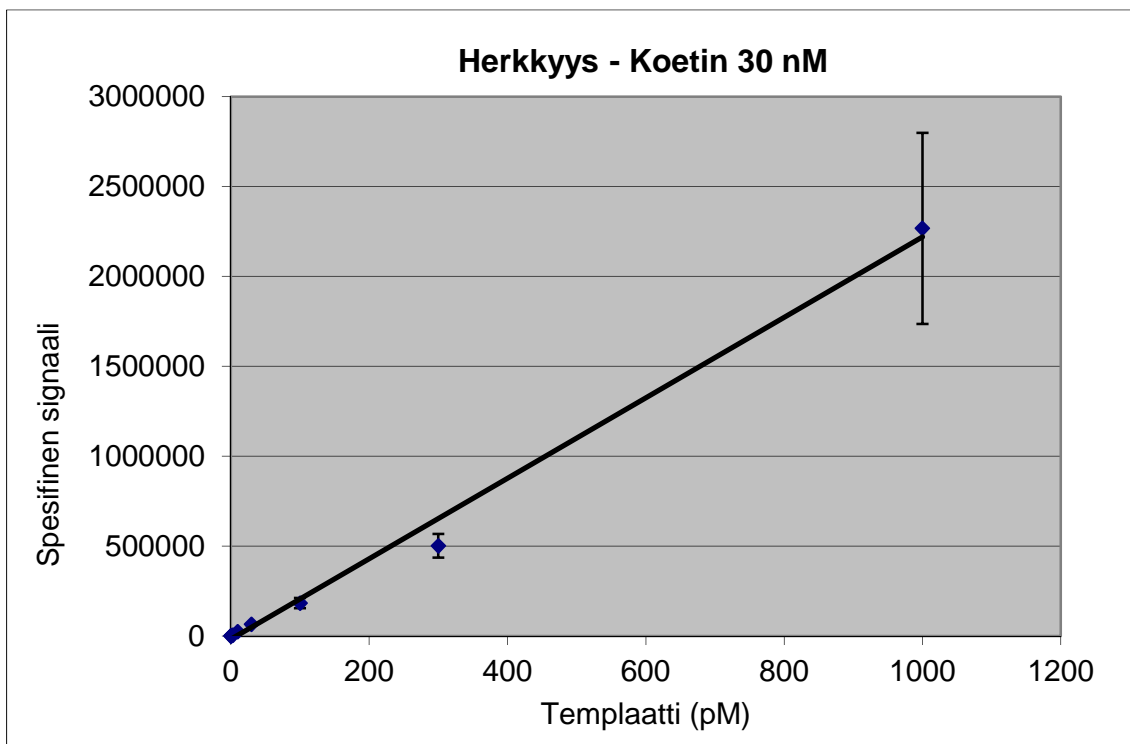
Kuvio 2 kuvaa kuinka suurissa templaattipitoisuuksissa, signaali ei enää kasva lineaarisesti. Tähän on syynä HOOK-efekti. Koettimet sitoutuvat eri templaattimolekyyleihin, eikä signaalia muodostu (arvot liite 8).



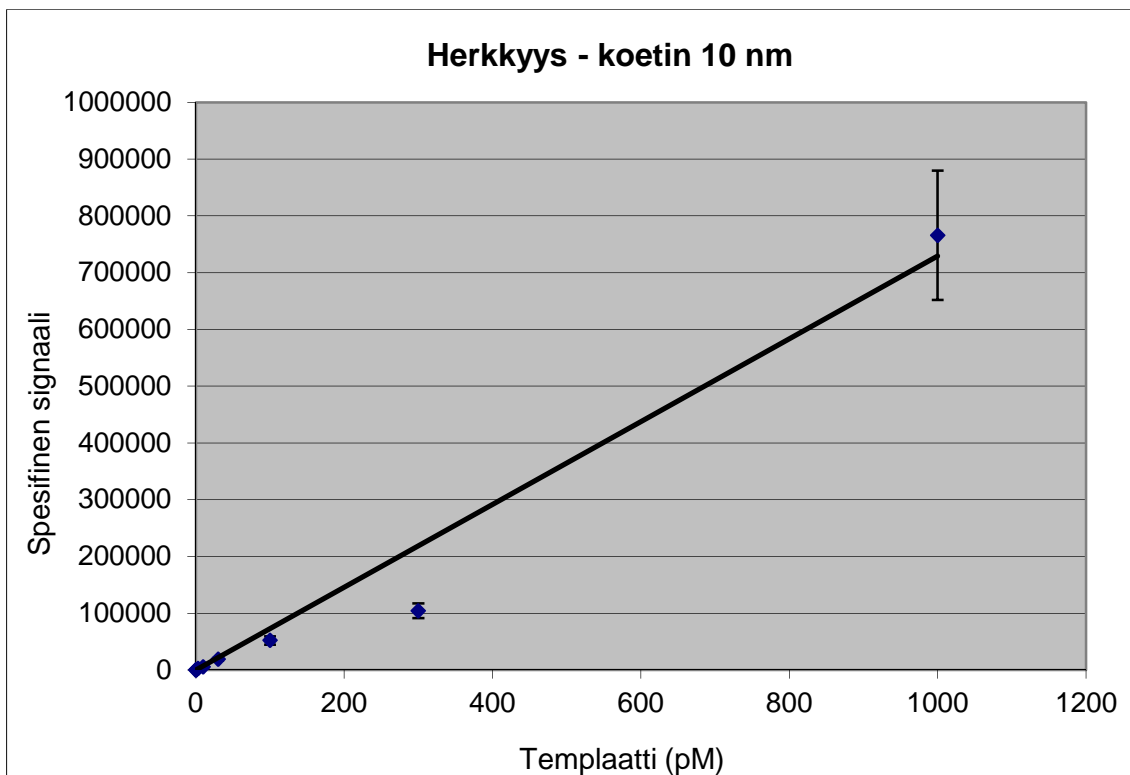
Kuvio 2. Hook-efekti

3.2 Herkkyysanalyysi koettimelle

Määritettiin systeemin herkkyys. Herkkyys kuvaa pienintä templaatin havaittavaa konsentraatiota. Herkkyydellä tarkoitetaan sitä näytteen konsentraatiota, jolla saadaan taustasignaalista merkittävästi poikkeava arvo. Kuvaajasta 3 voidaan päätellä, että templaatin pitoisuus 0,1 pM ei eroa taustasta, mutta 3,0 pM eroaa jo selvästi. Koetinpitoisuus oli määrityksissä 30 nM. Kuviosta 4 voidaan nähdä, kun koettimen pitoisuutta lasketaan 10 nm, saadaan vielä herkempi määrittäminen. Laskemalla herkkyyttä vastaava lukema ($OD+3 \cdot sd$) saadaan 30 nM:lle templaattipitoisuus 4,5 pM ja 10 nM pitoisuudella 2,5 pM (laskut ja arvot liitteenä 9 ja 10). Parannuksesta huolimatta 0,1 nM koetinpitoisuus on silti mahdoton havaita.



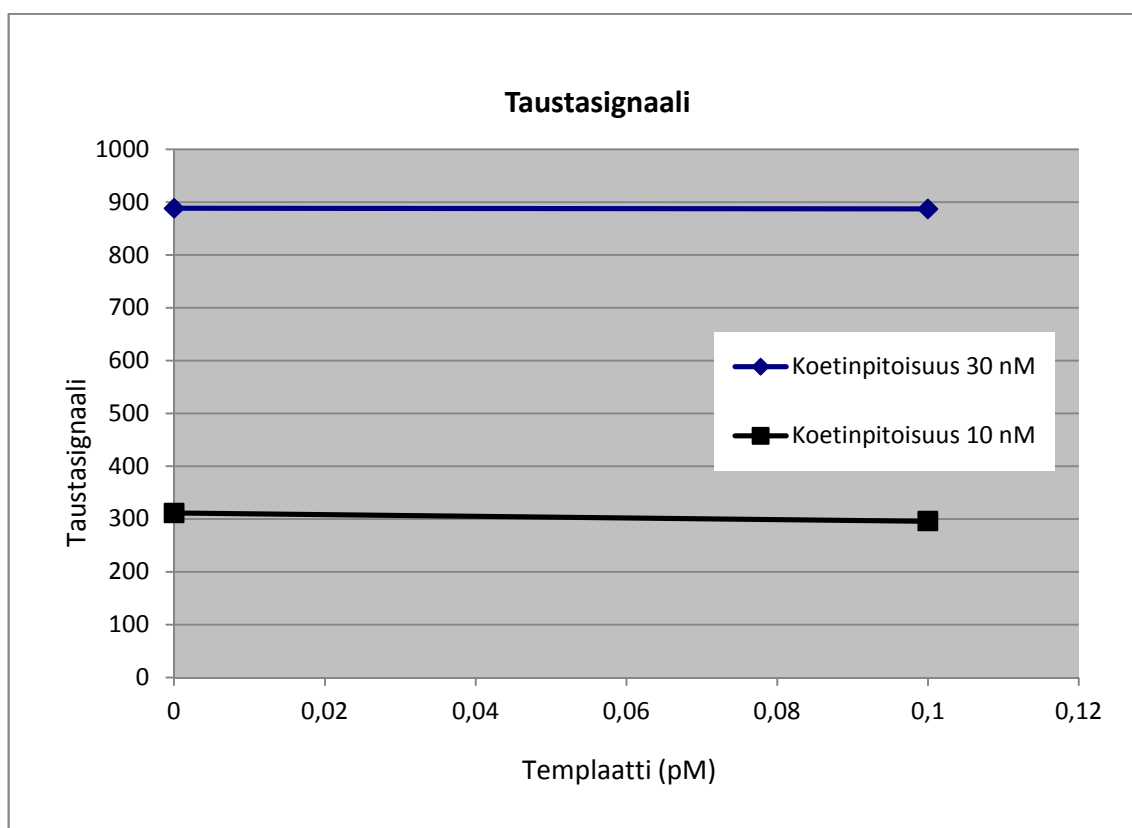
Kuvio 3. Herkkyiden analysointi pitoisuudella 30 nM.



Kuvio 4. Herkkyiden analysointi pitoisuudella 10 nM.

3.3 Taustasignaali

Taustasignaaleja vertailtiin koetinpitoisuuden ollessa 30 nM ja 10 nM. Ero oli kaksinkertainen. Ero aiheittuu todennäköisesti siitä, että korkeammassa koetin pitoisuudessa, vapaat koettimet vuorovaikuttavat keskenään ja synnyttävät havaittavaa taustaa. Taustasignaalien eroa kuvaajassa 5.

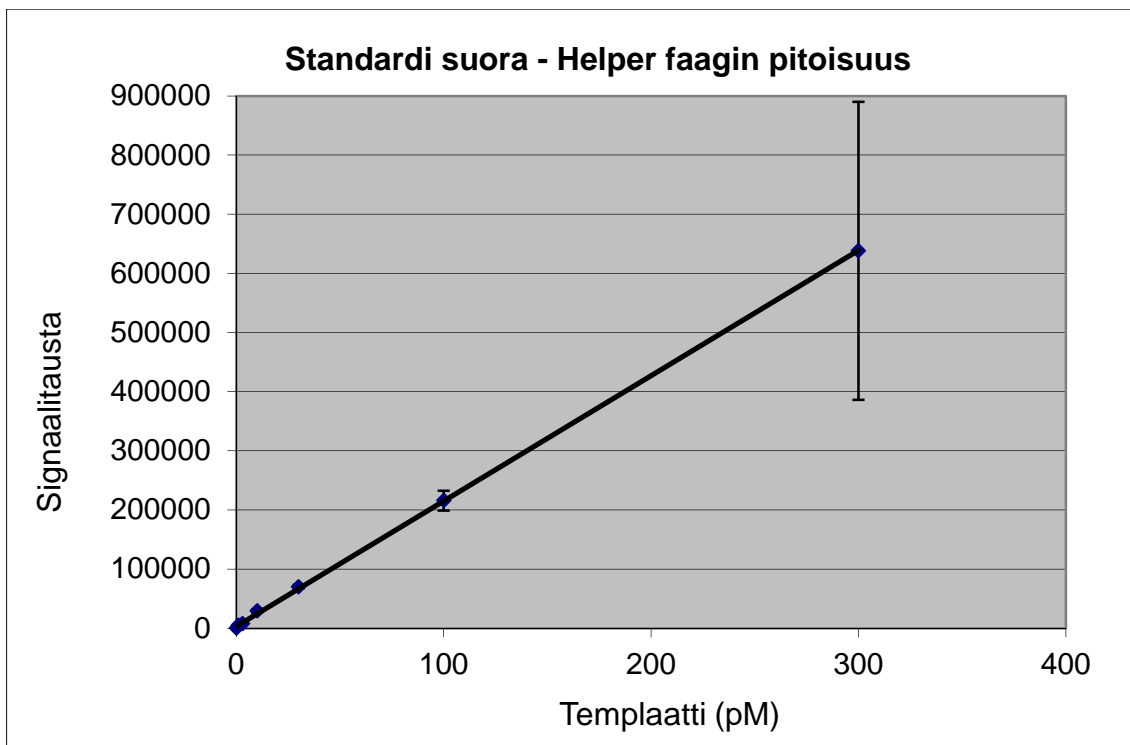


Kuvio 5. Taustasignaalien vertailu.

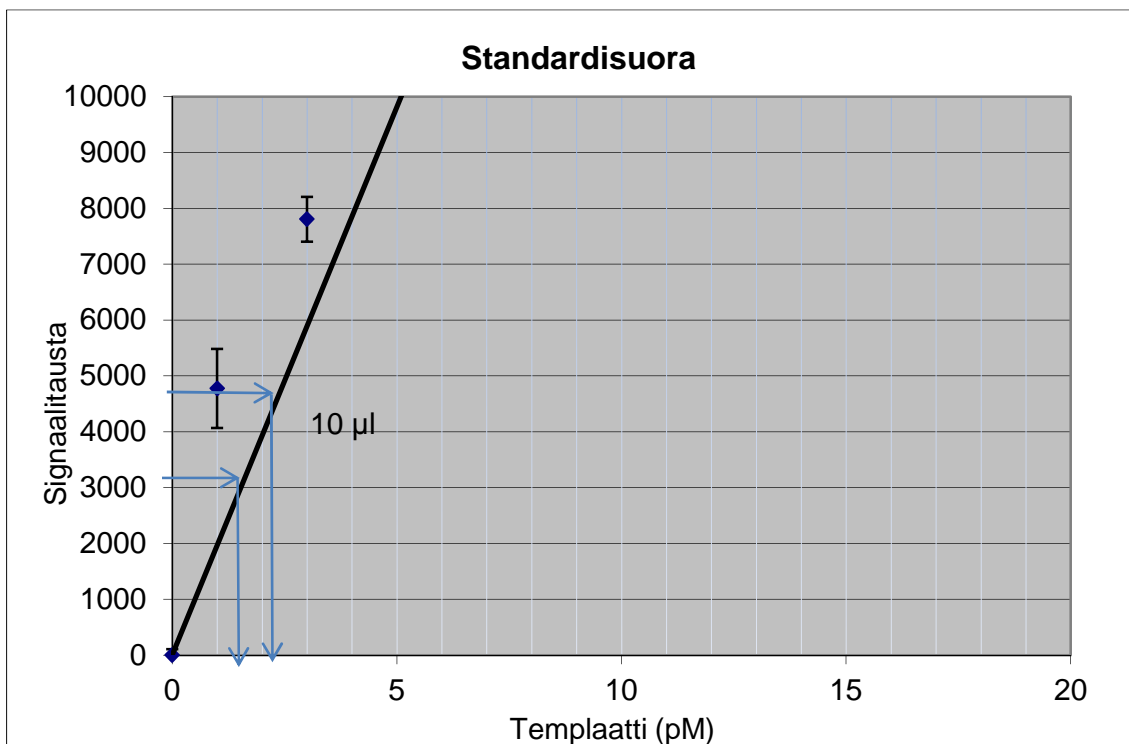
3.4 Kasvatetun auttajafaagin pitoisuus

Kasvatettujen auttajafaagien mitatuista pitoisuuksista saadaan standardisuora (kuvio 6). Faagiseoksen tiitteri on määritetty maljaustekniikalla, jolloin näytettä voidaan verrata standardisuoraan.

Määritetään standardisuoran avulla vastaavat tiitteripitoisuudet pipetoinneille 5 μ l ja 10 μ l:aa. Kuvaajan 7 avulla voidaan päätellä että tilavuudet vastaavat arvoja 1,5 tfu/ml ja 2,3 tfu/ml.



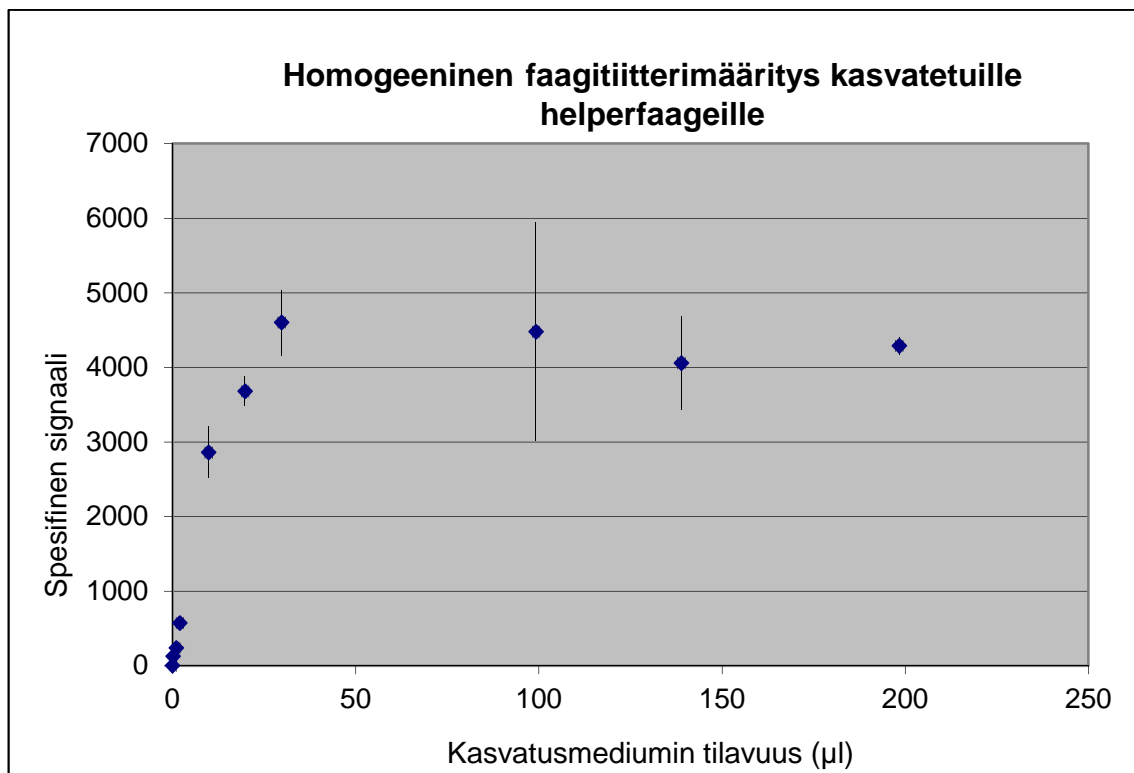
Kuvio 6. Lineaarinen standardisuora.



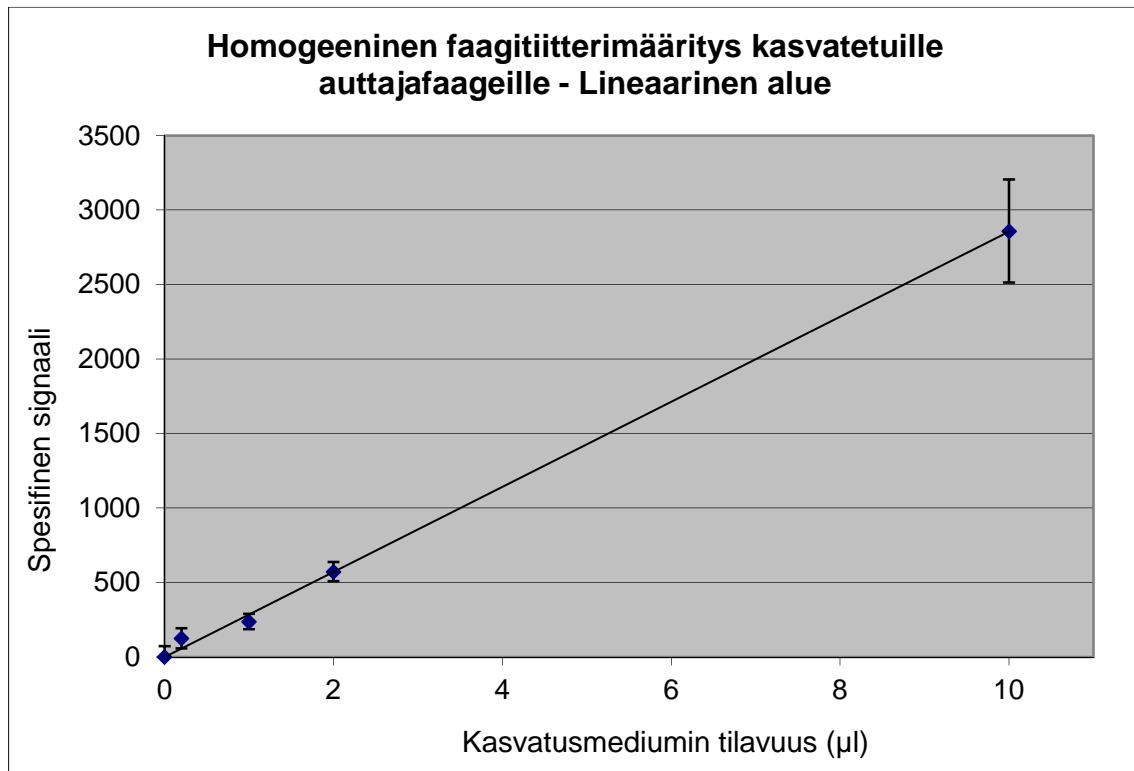
Kuvio 7. Lähikuva standardisuoja.

3.5 Homogeeninen faagitiitterimääritys kasvatetuille auttajafaageille

Faagien kasvatusmedium sisältää paljon proteiineja ja muuta solutuotetta. Kuvaaja 8 osoittaa, että kasvatusmediumin määrän lisääntyessä määrittelyn signaali heikkenee ja romahtaa. Tästä voidaan päätellä se että mikäli mittaus suoritetaan suoraan näyteliuoksesta, on käytettävä riittävän pieniä näytetilavuuksia. Kuvaajasta 9 nähdään suoran olevan lineaarinen vain 10 µl asti, kunnes signaali alkaa taittua.



Kuvio 8. Homogeeninen faagitiitterimääritys auttajafaageille.



Kuvio 9. Homogeeninen faagitiitterimääritys auttajafaageille – lineaarinen alue.

4 ARVIOINTI

Tämän opinnäytetyön tarkoitus oli soveltaa uutta fluoresoivaa leimateknologiaa homogeenisen filamenttifaagin titterimääritykseen. Kokeellinen osuuden soveltaminen aloitettiin optimoimalla koetinpitoisuus. Koetin pitoisuus 30 nm antoi suurimman spesifisen signaalin, ilman että taustasignaali nousi ongelmallisen korkeaksi. 10 nm koetin pitoisuus oli kuitenkin vielä herkempi tarkastellessa signaali-taustasuhteita.

Herkkyydeksi, joka ilmaisee suurinta havaittavaa konsentraatio 10 nm koetinpitoisuudella saadua 2,5 pM. Tämä herkkyys on riittävä mahdollistaen menetelmän hyödyntämisen faagipitoisuuksien analysointiin faafinäyttötekniikan yhteydessä. Huomattiin kuitenkin, että suurissa templaattipitoisuuksissa signaali ei enää kasva lineaarisesti HOOK -efektistä johtuen. Käytännön mittauksissa HOOK-efekti aiheuttaa riskin, että hyvin suuren faagimäärän sisältävän näytteen faagipitoisuus arvioidaan liian matalaksi. Tämän virheen välttämiseksi tulee näytteistä mitata muutamien eri laimennoksia, jotta voidaan varmistua, että joku näytteistä osuus määrittelyn lineaariselle alueelle.

Taustasignaalin havaittiin nousevan kaksinkertaiseksi 30 ja 10 n, pitoisuuksien välillä. Tämän epäiltiin johtuvan koettimien sitoutumisesta eri templaattimolekyyleihin, niin ettei signaalia muodostu.

Mitattaessa faagien pitoisuutta suoraan kasvatusmedimista, kasvatusmediumin ja solujen komponentit häiritsevät määrittelyä, mikäli niiden pitoisuus nousee määrittelyreaktiossa liian suureksi. Määrittely menetelmän herkkyyden ansioita voidaan kuitenkin käyttää pieniä näytemääriä (muutama mikrolitra) faagimäärän mittaamiseksi. Tällöin kasvatusliuoksen komponenttien pitoisuus jää mittaustilanteessa niin alhaiseksi, etteivät ne häirityse mittausta.

5 LÄHTEET

- ¹ Smith GP. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *SCIENCE (WASH.)* Vol. 228, no. 4705, pp. 1315-1317.
- ² Chasteen L, Ayris J, Pavlik P, Bradbury AR (2006). Eliminating helper phage from phage display. *Nucleic Acids Research* Vol. 34, no. 21, pp. e145-e145.
- ³ Smith GP, Petrenko VA (1997). Phage display. *Chem. Rev.* 97: 391–410.
- ⁴ Phage display. [Viitattu 27.3.2011]. Saatavana osoitteesta <http://www.creative-biolabs.com/phagedisplay1.htm>.
- ⁵ Kehoe JW, Kay BK (2005). Filamentous phage display in the new millennium. *Chemical Reviews*, Vol. 105 Issue 11, p4056-4072.
- ⁶ New England Biolabs FAQ's Phage Display Peptide Libraries (2007). [Viitattu online 20.1.2011]. Saatavana osoitteesta: http://www.neb.com/nebecomm/tech_reference/protein_tools/phdfaq.asp
- ⁷ Isolation of Bacteriophage from Sewage and Determination of Phage Titer. [Viitattu online 19.1.2011]. Saatavana osoitteesta: <http://highered.mcgraw-hill.com/sites/dl/free/0072487445/92720/Exercise37.pdf>
- ⁸ Edelman D. and Barletta J. (2003), Real-time PCR provides improved detection and titer determination of bacteriophage. *BioTechniques* 35:368-375
- ⁹ George P. Smith. Phage-Display Vectors and Libraries Based on Filamentous Phage Strain fd-tet. Division of Biological Sciences, University of Missouri. [Viitattu 13.1.2011]. Saatavana osoitteesta: www.biosci.missouri.edu/smithgp/PhageDisplayWebsite/PhageDisplayWebsiteIndex.html
- ¹⁰ Ballard V., Holm J., Edelberg J. (2006) Quantitative PCR-based approach for rapid phage display analysis: a foundation for high throughput vascular proteomic profiling. *Physiological Genomics* 26:202-208
- ¹¹ Anttila H. (2002) Kvantitatiivisen RT-PCR-menetelmän kehittäminen sytokeratiini-19 geeniekspression toteamiseksi. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu, bioalat.
- ¹² Alan D. (2009). Veriviljelyjen *Streptococcus pneumoniae* epäilyjen tunnistus AccuProbe testillä. Opinnäytetyö. Metropolia ammattikorkeakoulu,
- ¹³ Suominen I., Ollikka P. (2006) Yhdistelmä-DNA-tekniikan perusteet. Opetushallitus. Hakapaino Oy.

-
- ¹⁴ Herman B., Fluorescence Microscopy (1998). New York: Taylor and Francis Group.
- ¹⁵ Sameiro M., Gonçalves T. (2007), Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. Chem. Rev. 2009, 109, 190–212
- ¹⁶ Lehtonen J. (2009) Leima-annostelun ja kuivauksen vaikutus kuivakaivomäärityksen taustaan. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu, bioalat.
- ¹⁷ Zhang, Mingjun, Nelson, Bradley, Felder, Robin. (2007) Life Science Automation Fundamentals and Applications. Artech House Publishers
- ¹⁸ Hemmilä I., Ståhlberg T., Mottram P. (2011) Bioanalytical applications of labeling technologies. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences Vol. 38, No. 6 , p. 441-519
- ¹⁹ Oser A., K.Roth W., Valet G. (1988) Sensitive non-radioactive dot-blot hybridization using DNA probes labeled with chelate group substituted psoralen and quantitative detection by europium ion fluorescence. Nucleic Acids Res. 11; 16(3): 1181–1196.
- ²⁰ Molecular probe handbook, Invitrogen. [Viitattu online 2.1.2011]. Saatavana osoitteessa: www.invitrogen.com
- ²¹ Turun ammattikorkeakoulu luentomateriaali, Suominen I.
- ²² Papinkivi M. (2002) Energiansiirtoon perustuvat homogeeniset nukleinihappomääritykset. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu, bioalat.
- ²³ Laakso S. (2010) Rintasyövän diagnostiset määrittämenetelmät. Opinnäytetyö. Turun ammattikorkeakoulu, bioalat.
- ²⁴ Absolute astronomy, Stokes shift. [Viitattu online 3.3.2011]. Saatavana osoitteesta: http://www.absoluteastronomy.com/topics/Stokes_shift
- ²⁵ Karhunen U., Kostian L., Wang Q., Lamminmäki U., Soukka T. (2009) Fluorescence switching by oligonucleotide directed lanthanide chelate complementation
- ²⁶ Oser A., Valet G. (1990) Nonradioactive assay of DNA hybridization by DNA-template-mediated formation of a Ternary TbIII complex in pure liquid phase. Chem Int. Ed. 29, 1167-1169.

NAP-5 COLUMN PUHDISTUS

- 1 Tyhjennä pylväs
- 2 Tasapainota pylväs 10 ml oligonsäilytyspuskuria
- 3 Lisää näyte
- 4 Tasapainota näyte pylvääseen (näytteen kanssa yhteensä 500 µl)
Eluai näyte 500 µl:n tilavuuteen

HPLC PUHDISTUS OHJELMAT

HPLC ohjelma Eu-kelaatti

Time	A%	B%	C%	D%	Flow
0.00	100.00	0.0	0.0	0.0	0.65
2.00	100.00	0.0	0.0	0.0	0.65
3.00	86.00	14.0	0.0	0.0	0.65
28.00	65.00	35.00	0.0	0.0	0.65
30.00	0.0	100.0	0.0	0.0	0.65
35.00	0.0	100.0	0.0	0.0	0.65
38.00	100.0	0.0	0.0	0.0	0.65
45.00	100.0	0.0	0.0	0.0	0.65

HPLC ohjelma Eu-antenna

Time	A%	B%	C%	D%	Flow
0.00	100.00	0.0	0.0	0.0	0.50
2.00	100.00	0.0	0.0	0.0	0.50
3.00	86.00	14.0	0.0	0.0	0.50
24.00	70.00	30.00	0.0	0.0	0.50
33.00	0.0	100.0	0.0	0.0	0.50
38.00	0.0	100.0	0.0	0.0	0.50
44.00	100.0	0.0	0.0	0.0	0.50
60.00	100.0	0.0	0.0	0.0	0.50

PUSKUREIDEN KOOSTUMUS

Karbonaattipuskuri (10x)

500 nM Na_2CO_3

500 nM NaHCO_3

Suodatetaan 0,22 μm filtterillä (Millipore)

Oligon säilytyspuskurin koostumus

10 mM Tris

50 mM NaCl

pH 7,5

Määrittäpuskurin koostumus

50 mM Tris

600 mM NaCl

0,1% Tween 20

0,05% NaN_3

pH 7,7

ANTENNALEIMAUKSEN PITOISUUSLASKUT

Oligoa noin 50 nmol

MW = 363,272 g/mol

Antennaa pyritään saamaan 100 kertainen ylimäärä

$$\frac{125,7}{2} = 63 \text{ nmol} \cdot 100 = 6300 \text{ nmol}$$

$$\frac{25,1 \text{ nM} \cdot 0,0322 \text{ g}}{363,272 \text{ g/mol}} = 250 \text{ }\mu\text{l}$$

LA –MEDIUM, SB -MEDIUM

LA –medium (1000 ml)

10 g/l Tryptoni

5 g/l Hiivauute

5 g/l NaCl

15 g/l Agar

1. Liuota tryptoni, hiivauute ja NaCl milli-Q veteen ja säädä pH 7,0
2. Lisää agar
3. Steriloidaan liuos autoklaavissa
4. Jäähdytetään noin +50 °C
5. Lisätään kanamysiini (70 µg/ml), tetrasykliini (10 µg/ml) ja glukoosi (0,50 %).
Kaadetaan petrimaljalle noin 15 ml per malja.

SB- medium (1000 ml)

30 g Tryptoni

20 g Hiivauute

10 g MOPS

pH 7,0

MINIPREP KIT

1. Lisää sentrifugoidun pelletin päälle 500 µl puskuria P1 ja sekoita pipetoimalla.
2. Lisää puskuria P2 500 µl ja sekoita alle 5 min. käänneellen niin että solut muuttuvat sinisiksi.
3. Lisää 700 µl NB –bufferia yhteen putkeen ja sekoita käänneellen heti.
4. Siirrä 2 ml eppendorf putkiin ja sentrifugoi 10 min. 13 000 rpm.
5. Kerää 700 µl supernatanttia putkista spin column putkiin.
6. Sentrifugoi putkia 13 000 rpm, 1 min. ajan.
7. Lisää 500 µl PB-puskuria ja pese spin prep columni. Sentrifugoi kuten edellä.
8. Lisää PE-puskuria ja sentrifugoi kuten edellä kaksi kertaa, ottaen välillä supernatantin talteen. Anna seistä 15 minuuttia huoneenlämmössä.
9. Eluoi 50 µl:lla EB puskuria ja anna seistä pöydällä ja sentrifugoi kuten edellä.

TIITTERIMÄÄRITYSLASKU

Tiitterimäärittys 1

$$\frac{(100+116+230) \cdot 10^7 + (51+15+29) \cdot 10^8}{0,020} = 6,98 \cdot 10^{14} \text{ kpl/l}$$

Tiitterimäärittys 2

$$\frac{(101+210+50) \cdot 10^7 + (14+11+69) \cdot 10^8}{0,020} = 6,50 \cdot 10^{14} \text{ kpl/l}$$

KOETINPITOISUUDEN OPTIMOINTI

templaatti (pM)	counts						taustat
0	792	854	608	928	928	940	0
0,1	844	866	892	878	918	926	-1
0,3	1661	1899	1753	1594	1651	1657	814
1	2702	2893	2901	2465	2457	2701	1798
3	5732	6617	6072	5553	5796	5947	5064
10	23315	31793	25494	14611	15814	15833	23516
30	62416	67643	37230	44715	47894	45251	64141
100	156961	212801	182026	145999	97605	165232	183041
300	490343	549068	393208	208093	538429	542445	501810
1000	2741862	4362354	1807008	2712052	4362354	1807008	2266094

Punaisella merkityt arvot on poistettu laskutoimituksista

HOOK-EFEKTI

Templaatti (pm)	counts			tausta pois	k.a.	cv % < 10
0	320	300	314	0	311	3,30 %
0,1	286	328	274	-40	296	9,58 %
0,3	714	690	516	202	640	16,88 %
1	1200	1424	1036	722	1220	15,96 %
3	2595	2906	2921	2607	2807	6,56 %
10	3928	8484'	5861	5547	4895	27,93 %
30	23553	22088	19245	18931	21629	10,13 %
100	65266	65269	52507	52193	61014	12,07 %
300	130513	117481	104681	104367	117558	10,99 %
1000	60747	82808	76604	76290	73386	15,50 %

Punaisella merkityt arvot on poistettu laskutoimituksista

HERKKYYS – KOETIN 30 NM

Koetin 30 nm

templaatti (pM)	counts						taustat
0	792	854	608	928	928	940	0
0,1	844	866	892	878	918	926	-1
0,3	1661	1899	1753	1594	1651	1657	814
1	2702	2893	2901	2465	2457	2701	1798
3	5732	6617	6072	5553	5796	5947	5064
10	23315	31793	25494	14611	15814	15833	23516
30	62416	67643	'37230	44715	47894	45251	64141
100	156961	212801	182026	145999	97605	165232	183041
300	490343	549068	393208	208093	538429	542445	501810
1000	2741862	4362354	1807008	2712052	4362354	1807008	2266094

Punaisella merkityt arvot on poistettu laskutoimituksista

Saadaan menetelmän taustaa vastaava konsentraatio laskemalla $OD+3 \cdot sd$

$$888+3 \cdot 64=1080$$

HERKKYYS – KOETIN 10 NM

Templaatti (pm)	counts			tausta pois	k.a.	cv % < 10	sd
0	320	300	314	0	311	3,30 %	10
0,1	286	328	274	-40	296	9,58 %	28
0,3	714	690	516	202	640	16,88 %	108
1	1200	1424	1036	722	1220	15,96 %	195
3	2595	2906	2921	2607	2807	6,56 %	184
10	3928	8484	5861	5547	6091	37,54 %	2287
30	23553	22088	19245	18931	21629	10,13 %	2190
100	65266	65269	52507	52193	61014	12,07 %	7367
300	130513	117481	104681	104367	117558	10,99 %	12916
1000	607470	828089	766046	765732	733868	15,50 %	113775

Punaisella merkityt arvot on poistettu laskutoimituksista

Saadaan signaalin keskihajonta laskemalla $OD+(3*sd)$

$$311+3*10 = 342$$